

UJI SITOTOKSIK DAN UJI KOMBINASI FRAKSI ETIL ASETAT EKSTRAK ETANOL AKAR PASAK BUMI (EURYCOMA LONGIFOLIA JACK.) DAN DOKSORUBISIN PADA SEL LIMFOSIT

By LAELA HAYU NURANI

UJI SITOTOKSIK DAN UJI KOMBINASI FRAKSI ETIL ASETAT EKSTRAK ETANOL AKAR PASAK BUMI (*EURYCOMA LONGIFOLIA* JACK.) DAN DOKSORUBISIN PADA SEL LIMFOSIT

Laela Hayu Nurani¹, Sitarina Widyarini², Ahmad Mursyidi¹

¹Dosen Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan

²Dosen Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada

ABSTRAK

Uji efek sitotoksik dan uji kombinasi fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi (*Eurycoma longifolia*, Jack.) dan doxorubisin telah dilakukan terhadap sel normal limfosit secara *in vitro*. Fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi dan kombinasinya dengan doxorubisin diuji dengan metode MTT. Prinsip kerja metode MTT adalah dengan mengukur aktivitas dehidrogenase mitokondria pada sel-sel hidup yang memiliki kemampuan untuk mengkonversi MTT menjadi formazan. Pengujian sitotoksik ekstrak fraksinasi dilakukan pada konsentrasi 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25 $\mu\text{g/mL}$ dan doxorubisin pada konsentrasi 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 $\mu\text{g/mL}$. Dari pengujian yang dilakukan diperoleh nilai IC_{50} fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi dan doxorubisin terhadap sel limfosit masing-masing 44 $\mu\text{g/mL}$ dan 1,1 $\mu\text{g/mL}$. Hasil uji kombinasi diperoleh nilai CI (*combination index*) tertinggi adalah pada konsentrasi kombinasi 22 $\mu\text{g/mL}$ (fraksi etil asetat ekstrak etanol APB) dan 0,5547 $\mu\text{g/mL}$ (doxorubisin) yaitu sebesar 73,282 ($\text{CI} > 1 = \text{antagonis}$). Hasil penelitian menunjukkan fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi memiliki toksisitas yang lebih rendah dibandingkan doxorubisin dan dapat digunakan untuk kombinasi pada kemoterapi dengan doxorubisin.

Kata Kunci : Akar pasak bumi, doxorubisin, uji sitotoksik, uji kombinasi, sel limfosit.

ABSTRACT

The cytotoxicity and combination test of ethyl acetate fraction of ethanolic extract of Pasak bumi roots (*Eurycoma longifolia* Jack.) and doxorubicin have been made to the normal lymphocyte cells *in vitro*. The tests were carried out by using MTT method. Principle of the MTT method is to measure the mitochondrial dehydrogenase activity in living cells that have the ability to convert MTT into formazan. Cytotoxicity test for fraction performed at concentrations of 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 $\mu\text{g/mL}$ and the concentrations of doxorubicin at 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 $\mu\text{g/mL}$. From the tests IC_{50} values obtained ethyl acetate fraction of ethanolic extract of pasak bumi roots and doxorubicin against lymphocyte cells each 44 $\mu\text{g/mL}$ and 1.1 $\mu\text{g/mL}$. The results of combination index (CI) value is 73,282 ($\text{CI} > 1 = \text{antagonist}$) at concentration of the combination 22 $\mu\text{g/mL}$ for ethyl acetate fraction and 0,5547 for doxorubicin. The Results showed ethyl acetate fraction of ethanolic extract of the pasak bumi roots has lower toxicity than doxorubicin and it can be used for the combination chemotherapy with doxorubicin.

Keywords : Pasak bumi roots, doxorubicin, Cytotoxicity test, combination test, lymphocyte cells

PENDAHULUAN

Usaha yang banyak dilakukan untuk mengobati kanker adalah dengan pemberian agen kemoterapetik. Doksorubisin merupakan agen kemoterapi antikanker yang terbukti efektif digunakan pada terapi kanker secara luas [1], namun penggunaannya secara berkepanjangan dapat melemahkan sistem imunitas tubuh [2-4]. Doksorubisin bekerja tidak selektif karena bersifat toksik baik pada sel kanker maupun sel normal, terutama sel normal yang kecepatan proliferasinya tinggi seperti pada sumsum tulang belakang [5]. Mekanisme toksisitas doksorubisin telah banyak diketahui [6]. Toksisitas kronis doksorubisin kemungkinan diperantarai oleh konversi metabolik doksorubisin menjadi doxorubicinol yang melibatkan berbagai enzim antara lain karbonil reduktase. Mekanisme utama toksisitas doxorubicinol terjadi karena interaksinya dengan besi dan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) yang merusak makromolekul sel [6]. Doksorubisin dengan adanya gugus quinon yang dimilikinya juga mampu menghasilkan radikal bebas baik pada sel normal maupun sel kanker [7].

Doksorubisin dapat membentuk *intermediate* radikal semiquinon, yang dapat bereaksi dengan oksigen menghasilkan radikal anion superoksida, yang selanjutnya akan akan menghasilkan hidrogen peroksida dan radikal hidroksil yang menyerang DNA dan mengoksidasi basa pada DNA. Pembentukan radikal bebas ini secara signifikan distimulasi oleh interaksi antara doksorubisin dengan besi. Pertahanan enzimatis dalam sel seperti superoksid dismutase dan katalase merupakan hal penting untuk menjaga sel dari toksisitas doksorubisin [8]. Doksorubisin dapat mempengaruhi fungsi sistem imun tikus yang diinduksi kanker dengan menurunkan IL-2 dan produksi

IFN- γ secara signifikan, sehingga menyebabkan penurunan sel sitotoksik NK, proliferasi limfosit, dan rasio sel limfosit TCD4+/CD8+ [4] serta meningkatkan ekspresi CD4 [9]. Atas dasar itu maka perlu dicari alternatif berupa kombinasi antara obat herbal dan obat sintesis untuk mengatasi resistensi dan efek samping pada aplikasi penggunaannya.

Salah satu tanaman yang banyak diteliti saat ini adalah akar pasak bumi (*Eurycoma longifolia*, Jack.). Senyawa yang terkandung dalam *E. longifolia* adalah kuasinoid [10,11] serta alkaloid 9-metoksisanthin-6-on [12, 13], dan alkaloid canthinone [11,14]. Akar pasak bumi mempunyai potensi sebagai antikanker dan kemopreventif. Pasak bumi adalah salah satu tanaman yang telah digunakan sebagai obat untuk detoksikasi, antioksidan radikal bebas, serta antikanker [15,16]. Secara *in vitro*, ekstrak etanol akar pasak bumi memiliki aktivitas antiproliferasi terhadap sel MCF-7 dan T47D yang merupakan model sel kanker payudara [12]. Fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi mempunyai nilai IC₅₀ lebih kecil dibandingkan fraksi tak larut etil asetat, ekstrak etanol dan ekstrak kloroform yang diujikan pada sel T47D [17]. Kandungan *eurycomanone* pada *E. longifolia* juga dilaporkan mempunyai aktivitas imunomodulator [15]. Pasak bumi sebagai imunostimulator dapat mengaktifasi respon imun seluler oleh senyawa kuasinoidnya [18]. Dari uraian diatas perlu dilakukan uji sitotoksik fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi terhadap sel limfosit untuk mengetahui sifat sitotoksik fraksi tersebut terhadap sel normal dan untuk melihat potensi fraksi tersebut untuk meminimalisir efek samping doksorubisin jika dikombinasi dengan doksorubisin

Uji sitotoksitas fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasar bumi terhadap sel limfosit dilakukan dengan

menggunakan metode MTT. Prinsip metode MTT adalah pengukuran yang dilakukan secara kolorimetri yang didasarkan terjadinya pembentukan garam formazan tidak larut berwarna ungu dari reaksi reduksi tetrazolium yang sifatnya larut dalam air dengan menghasilkan larutan berwarna kuning. Reagen MTT hanya bereaksi dengan sel yang masih hidup kemudian dipecah melalui reaksi reduksi oleh sistem reduktase suksinat tetrazolium membentuk formazan [19].

Penelitian ini diharapkan memberikan hasil yang dapat membuktikan dan melihat dari aktivitas sitotoksik fraksi dan hal ini dapat menunjukkan akar pasak bumi mampu dijadikan sebagai pendamping obat kemoerapi.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Rotary Evaporator, Cawan Petri, Stirer, Haemocytometer, Sentrifuge, Sentrifuge, Panci Infus, Alat-Alat Gelas, Plate KLT, Chamber, Autoklaf, Oven, Inkubator CO₂, Laminar Air Flow Cabinet, Efendorf, Cell Counter, Microplate 96 Sumuran Dan Elisa Reader.

Serbuk akar pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack), Doxorubicin (Actavis Indonesia), Etanol 70%, Etil Asetat, N-Heksan, MTT [3-(4, 5-Dimetiltiazol-2-Il)-2, 5-Difeniltetrazolium Bromida], NH₄Cl, FBS (Fetal Bovine Serum) 10%, Tripsin EDTA, DMSO, Akuades, RPMI 1640, PBS (Phospat Buffer Saline), Penisilin-Sterptomisin 1% V/V, Sds 10% dalam HCl 0,01 N, NaHCO₃, Fungison 0,5%(V/V) (Gibco).

Metode

1. Ekstraksi akar pasak bumi

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan merendam 1 kg serbuk ke dalam

etanol 70% analisis sebanyak 3 liter distirer selama 3 jam kemudian didiamkan selama 24 jam, kemudian maserat disaring menggunakan corong *buchner* yang telah dilapisi kertas saring. Filtrat diuapkan dengan rotary evaporator dengan suhu 60°C sampai diperoleh ekstrak kental [17].

2. Pembuatan Fraksi Etil asetat

Pembuatan fraksi etil asetat dilakukan dengan cara 95% ekstrak etanol dilakukan partisi dengan etil asetat 1: 2,5 (ekstrak etanol : etil asetat). Partisi dilakukan 3× dan fraksi etil asetat dipekatkan. Fraksi etil asetat dikumpulkan dan kemudian dievaporator sampai diperoleh fraksi kental [17].

3. Analisis kualitatif

Analisis kualitatif dengan metode KLT, dengan menotolkan tiga sampel ke dalam KLT berupa 1) fraksi tidak larut etil asetat, 2) fraksi larut etil asetat dan 3) ekstrak etanol 70% dielusi dengan fase diam menggunakan silica Gel F₂₅₄ dan fase gerak etil asetat analitik dan n-heksan analitik (1:1) dibandingkan dengan standar *eurycumanone*. Hasil dilihat pada UV 254nm dan 366nm, kemudian di hitung nilai Rf [17].

4. Isolasi Sel limfosit

Limfosit diisolasi dari limfa mencit. Limfa yang telah bersih dimasukkan ke dalam cawan petri steril kemudian ke dalam limfa disuntikkan spuit yang berisi medium komplit dan ditekan untuk mengeluarkan sel-sel limfosit. Setelah limfosit dikeluarkan dari limfa, kapsul limfa dibuang dan suspensi limfosit dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril dan disentrifus pada 2500 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, dan ditambahkan NH₄Cl untuk melisis eritrosit, lalu disentrifus pada 2500 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, pelet dicuci dengan RPMI dan disentrifus pada 2500 selama 5 menit. Supernatan dibuang, endapan

ditambahkan RPMI, lalu dihitung jumlah sel dengan menggunakan *haemocytometer*. Setelah dihitung suspensi sel siap dikultur pada mikroplate 96 dengan volume 100 μL /sumuran di dalam inkubator CO_2 5% 37°C selama 24 jam [20].

5. Uji Sitotoksik Dengan Metode MTT Assay

Sampel akar pasak bumi dan doxorubicin 100 μL dalam media RPMI 1640 dengan konsentrasi fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dan doxorubicin dengan konsentrasi 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Dimasukkan ke dalam plate 96 sumuran yang berbeda yang sudah berisi sel limfosit. Selanjutnya kultur inkubasi dalam inkubator CO_2 5% selama 24 jam pada suhu 37°C . Masin [35] asing sumuran ditambahkan larutan 10 μL MTT 5 mg/mL . Kemudian plate yang telah ditambahkan MTT diinkubasi lagi 4 jam pada suhu 37°C . Ditambahkan reagen stopper SDS 10% dalam asam klorida 0,01N sebanyak 100 μL pada tiap sumuran dan didiamkan sampai 24 jam. Selanjutnya diukur absorbansinya dengan microplate reader pada panjang gelombang 595 nm [21,17].

6. Uji Kombinasi fraksi etik asetat ekstrak etanol akar pasak bumi dan doksorubisin

[17] Sel sebanyak 100 μL didistribusikan ke dalam plate 96 sumuran dan diinkubasi selama 24 jam untuk beradaptasi dan menempel di sumuran. Ambil plate yang telah berisi sel dari inkubator. Masukkan seri konsentrasi akar pasak bumi dan doxorubicin ke dalam sumuran masing-masing 50 μL dengan 4 seri konsentrasi terdiri dari : IC_{50} , $\frac{3}{4} \text{IC}_{50}$, $\frac{1}{2} \text{IC}_{50}$, dan $\frac{1}{4} \text{IC}_{50}$. Inkuba: [23] selama 24 jam. Ditambahkan reagen MTT 50 μL ke setiap sumuran, termasuk kontrol media (tanpa sel). Inkubasi sel selama 4 jam di

dalam inkubator (sampai terbentuk formazan ditambahkan stopper SDS 10% dalam 0,1N HCl. Baca absorbansi dengan ELISA reader pada panjang gelombang 595nm [21,17].

ANALISIS DATA

1. Uji sitotoksik

Parameter uji sitotoksitas (IC_{50}) regresi linear hubungan antara log konsentrasi vs % kehidupan

$$\% \text{ kehidupan} = \frac{(\text{absorbansi pada perlakuan} - \text{absorbansi blanko})}{\text{absorbansi pada kontrol negatif} - \text{absorbansi blanko}} \times 100\%$$

2. Uji Kombinasi fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi dan doksorubisin

Perhitungan harga CI (*Combination Index*) menggunakan aplikasi *Compusyn*, dengan hasil data berupa *Combination index* pada seluruh perlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstrak etanol akar pasak bumi

Pembuatan ekstrak [38] etanol akar pasak bumi dilakukan di laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan. Ekstrak akar pasak bumi dibuat dengan metode maserasi yaitu dengan cara perendaman dan pengadukan serbuk akar pasak bumi menggunakan cairan penyari etanol 70% selama 24 jam. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi adalah etanol 70%, pertimbangan menggunakan pelarut etanol 70% ini berdasarkan sifat etanol yang semipolar sehingga menguntungkan untuk menyari senyawa-senyawa yang sifatnya polar sampai nonpolar, termasuk diantaranya *euricumanone*. Berdasarkan penelitian [17] disebutkan bahwa [34] IC_{50} terlihat bahwa ekstrak etanol mempunyai efek sitotoksik yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak kloroform dan ekstrak air pada sel T47D. Hal tersebut menunjukkan bahwa etanol merupakan pelarut yang mampu menyari zat aktif sitotoksik dalam

tanaman akar pasak bumi yang lebih baik dibandingkan kloroform dan air. Hasil rendemen yang diperoleh dari 1 kg serbuk akar pasak bumi adalah 2,99%. Secara organoleptis ekstrak yang diperoleh berwarna coklat gelap, kental, rasa pahit, dan mempunyai bau yang khas.

Fraksi etil asetat akar pasak bumi

Tahap selanjutnya dari penelitian ini adalah fraksinasi. Fraksinasi disini adalah proses pemisahan senyawa aktif dalam *crude extract* sampel berdasarkan tingkat kepolarannya. Dalam proses ini dilakukan fraksinasi dengan etil asetat. Pemilihan etil asetat atas dasar polaritas yang berbeda dari etanol sehingga diharapkan adanya pemisahan senyawa dalam ekstrak etanol. Selain itu alasan penggunaan fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi karena nilai IC_{50} fraksi etil asetat lebih kecil ($55,2 \pm 31,6 \mu\text{g/mL}$) dibandingkan fraksi tak larut etil asetat ($194,9 \pm 7,8 \mu\text{g/mL}$), ekstrak etanol ($167,7 \pm 76,7 \mu\text{g/mL}$) dan ekstrak kloroform ($370,0 \pm 70,4 \mu\text{g/mL}$) yang diujikan pada sel T47D [17]. Senyawa dengan IC_{50} yang lebih kecil, lebih mempunyai potensi untuk dikembangkan sebagai antikanker [22]. Namun selain pentingnya uji terhadap sel kanker juga perlu diujikan pada sel normal untuk melihat ketoksikan suatu senyawa pada sel normal.

Ekstrak yang diperoleh kemudian difraksinasi dengan etil asetat, sebanyak 95% dari ekstrak difraksinasi dengan etil asetat 1 : 2,5 (etil asetat : ekstrak), partisi dilakukan 3× dan fraksi etil asetat dipekatkan. Fraksi etil asetat dikumpulkan dan kemudian di *rotary evaporator* sampai diperoleh fraksi kental. Cara fraksinasi ini diharapkan mampu melarutkan zat-zat 9 dengan optimal. Dalam penelitian ini diperoleh fraksi yang larut etil asetat dan tidak larut etil asetat, dengan rendemen fraksi yang larut etil asetat sebesar 19,73% dan yang tidak larut etil asetat 73,38%.

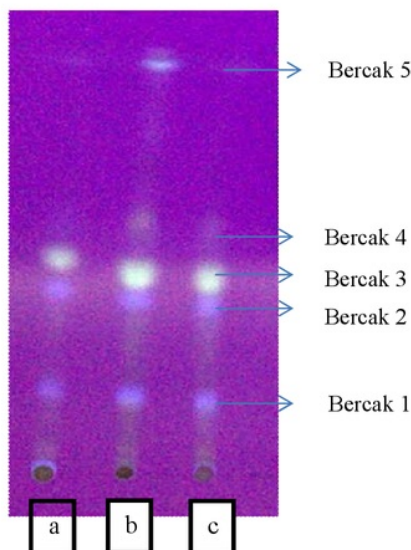
Uji kualitatif fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi

Uji kualitatif senyawa dengan metode KLT merupakan cara sederhana untuk mengidentifikasi suatu senyawa. Data yang diperoleh berupa harga R_f dan warna bercak kromatogram yang diperoleh dari pengembangan bercak pada plat kromatografi lapis tipis. Uji ini bertujuan untuk melihat kebenaran bahwa fraksi etil asetat akar pasak bumi mengandung senyawa *eurycomanone*. Pada uji ini gunakan fase diam silika gel G 245 yang telah ditotolkan sampel uji (fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi, fraksi tidak larut etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi dan ekstrak etanol akar pasak bumi) kemudian di kembangkan pada fase gerak etil asetat analitik dan *n*-heksane analitik dengan perbandingan 1 : 1. Hasil KLT yang diperoleh menunjukkan bahwa sampel berfluoresensi biru pada UV 254 nm dan berfluoresensi pada UV 366 nm. Nilai 15 hasil uji kualitatif akar pasak bumi dapat dilihat pada Gambar 1.

Pada gambar 1 dapat dilihat bahwa adanya pemisahan komponen setelah dilakukan elusi dengan fase gerak etil asetat : *n*-heksan (1:1). Hal ini menunjukkan bahwa baik proses ekstraksi ataupun fraksinasi dapat menarik komponen-komponen zat aktif. Hasil profil kromatografi lapis tipis pada ekstrak etanol akar pasak bumi terlihat bercak 29 g lebih banyak dibandingkan dengan fraksi etil asetat dan fraksi tidak larut etil asetat, hal ini dimungkinkan karena pelarut etanol merupakan pelarut yang dapat menarik banyak senyawa, sedangkan etil asetat mempunyai kepolaran yang berbeda dengan etanol sehingga dapat menarik lebih sedikit senyawa yang sudah 33 ada pada ekstrak etanol. Bercak pada fraksi etil asetat dan fraksi tidak larut etil asetat terlihat sama dengan nilai R_f bercak ketiga yaitu 0,55, namun yang membedakan bercak keduanya adalah ketajaman bercaknya, dimana bercak fraksi etil asetat lebih

tajam dibandingkan fraksi tidak larut etil asetat. Pada penelitian ini yang akan digunakan sebagai bahan uji penelitian adalah fraksi etil asetat akar pasak bumi hal ini dikarenakan pada penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa fraksi

etil asetat akar pasak bumi mempunyai nilai ketoksikan yang lebih tinggi terhadap sel kanker T47D dibandingkan fraksi tidak larut etil asetat dan ekstrak etanol akar pasak bumi [17].



Gambar 1. Profil Kromatografi Lapis Tipis (UV 366nm) fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi pada a. Fraksi tidak larut etil asetat, b. Ekstrak etanol, c. Fraksi larut etil asetat.

Uji Sitotoksik Dengan Metode MTT Assay

Uji sitotoksik ini bertujuan untuk mengetahui efek sitotoksik fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi dan doksorubisin terhadap sel limfosit (sel normal). Uji sitotoksik merupakan orientasi awal untuk menentukan

konsentrasi senyawa uji yang digunakan dalam uji selanjutnya seperti uji kombi¹⁵. Hasil perlakuan dengan uji MTT pada penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 2, terlihat³⁷ mbaran kristal kristal berwarna ungu yang tidak larut dalam air tetapi larut dalam SDS 10%.



Gambar 2. Kristal formazan dilihat dari mikroskop dengan pembesaran 400 (a) sel sebelum diberi perlakuan MTT, (b) sel mati, (c) sel hidup.

Parameter yang digunakan untuk menyatakan potensi sitotoksik adalah harga IC_{50} (*Median Inhibitory Concentration*) yang merupakan manifestasi dari potensi ketoksikan [21,22]. Harga IC_{50} merupakan kadar yang mampu menghambat proliferasi sel sebesar 50% populasi. Harga IC_{50} diperoleh dengan metode regresi linear, dicari dari persamaan garis hubungan antara log konsentrasi vs % kehidupan yang dihasilkan, harga probit 5 dimasukkan ke dalam persamaan garis lurus sehingga diperoleh log kadar yang menyebabkan penghambatan 50% populasi sel [23].

Alasan penggunaan fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi selain karena nilai IC_{50} fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi lebih kecil ($55,2 \pm 31,6 \mu\text{g/mL}$) dibandingkan fraksi tak larut etil asetat ($194,9 \pm 7,8 \mu\text{g/mL}$), ekstrak etanol ($167,7 \pm 76,7 \mu\text{g/mL}$) dan ekstrak kloroform ($370,0 \pm 70,4 \mu\text{g/mL}$) yang diujikan pada sel T47D [17]. Senyawa dengan IC_{50} yang lebih kecil, lebih mempunyai potensi untuk dikembangkan sebagai antikanker [22], selain itu *American National Cancer Institute* (NCI) juga menyebutkan bahwa kriteria ketoksikan suatu senyawa terhadap sel kanker

dimana nilai $IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/mL}$ = sangat aktif, $IC_{50} 21-200 \mu\text{g/mL}$ = cukup aktif, $IC_{50} 201-500 \mu\text{g/mL}$ = lemah [24]. Berdasarkan penelitian Nurani [17] nilai IC_{50} pada fraksi etil asetat termasuk dalam kategori cukup aktif berpotensi untuk sitotoksik kanker dibandingkan dengan fraksi tidak larut etil asetat dan ekstrak etanol dari akar pasak bumi. Kategori nilai IC_{50} oleh NCI tersebut juga menggambarkan bahwa semakin kecil nilai IC_{50} maka semakin toksik senyawa tersebut dan sebaliknya semakin besar nilai IC_{50} maka semakin kecil potensinya ketoksikannya. Namun selain pentingnya uji terhadap sel kanker juga perlu diujikan pada sel normal untuk melihat ketoksikan suatu senyawa pada sel normal, sehingga pada penelitian ini dilakukan uji sitotoksik terhadap sel limfosit (sel normal), untuk melihat ketoksikan fraksi etil asetat akar pasak bumi terhadap sel limfosit dan membandingkan ketoksikannya dengan agen kemoterapi doksorubisin.

Senyawa dengan IC_{50} yang lebih besar mempunyai efek ketoksikan yang lebih rendah terhadap sel normal [17, 25, 26]. Hasil IC_{50} fraksi etil asetat ekstrak [32] etanol akar pasak bumi dan doksorubisin pada penelitian ini ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Nilai IC_{50} fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi dan doksorubisin pada sel limfosit

| | Nilai IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) |
|---|--------------------------------------|
| Fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi | 44 |
| Doksorubisin | 1,1 |

Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa nilai IC_{50} fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi ($44 \mu\text{g/mL}$) lebih besar dibandingkan dengan doksorubisin ($1,1 \mu\text{g/mL}$) berdasarkan hasil tersebut fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi mempunyai nilai IC_{50} yang lebih besar dibandingkan doksorubisin, hal ini menunjukkan bahwa

doksorubisin mempunyai efek yang lebih toksik dibandingkan fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi terhadap sel limfosit. Hal ini mungkin doksorubisin bekerja tidak selektif karena bersifat toksik baik pada sel kanker maupun sel normal, terutama sel normal yang kecepatan proliferasinya tinggi seperti pada sumsum tulang belakang [5].

Mekanisme toksisitas doksorubisin telah banyak diketahui [6]. Toksisitas kronis doksorubisin kemungkinan diperantarai oleh konversi metabolik doksorubisin menjadi doxorubicinol yang melibatkan berbagai enzim antara lain karbonil reduktase. Mekanisme utama toksisitas doxorubicinol terjadi karena interaksinya dengan besi dan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) yang merusak makromolekul sel [6]. Doksorubisin dengan adanya gugus quinon yang dimilikinya juga mampu menghasilkan radikal bebas baik pada sel normal maupun sel kanker [7]. Doksorubisin dapat membentuk *intermediate* radikal semiquinon, yang dapat bereaksi dengan oksigen menghasilkan radikal anion superoksida, yang selanjutnya akan menghasilkan hidrogen peroksida dan radikal hidroksil yang menyerang DNA dan mengoksidasi basa pada DNA. Pembentukan radikal bebas ini secara signifikan distimulasi oleh interaksi antara doksorubisin dengan besi. Pertahanan enzimatis dalam sel seperti superoksida dismutase dan katalase merupakan hal penting untuk menjaga sel dari toksisitas doksorubisin [8]. Hasil uji

31 sitotoksik ini akan menjadi acuan untuk uji selanjutnya yaitu uji kombinasi fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi dengan doksorubisin.

Uji Kombinasi Fraksi etil asetat ekstrak Etanolik akar pasak bumi dan Doksorubisin Terhadap Sel Limfosit

Penggunaan fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi bertujuan untuk ko-kemoterapi atau pendamping kemoterapi yang bertujuan untuk meminimalisir efek samping yang disebabkan oleh agen kemoterapi. Hasil uji sitotoksik yang dilakukan menunjukkan bahwa fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi mempunyai nilai IC_{50} yang lebih besar dibandingkan doksorubisin pada sel limfosit hal ini menunjukkan bahwa doksorubisin lebih toksik dibandingkan fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi. Oleh karena itu, dilakukan uji kombinasi 36 untuk mengetahui konsentrasi kombinasi terbaik yang akan digunakan untuk uji selanjutnya yaitu uji imunositokimia. Pada uji ini dilakukan pada 4 konsentrasi yaitu IC_{50} , $3/4 IC_{50}$, $1/2 IC_{50}$, $1/4 IC_{50}$.

Tabel 2. Konsentrasi pada uji kombinasi fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi dan doksorubisin pada sel limfosit

| Konsentrasi | Fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi ($\mu g/mL$) | Doksorubisin ($\mu g/mL$) |
|---------------|--|-----------------------------|
| IC_{50} | 44 | 1,1094 |
| $3/4 IC_{50}$ | 33 | 0,83205 |
| $1/2 IC_{50}$ | 22 | 0,5547 |
| $1/4 IC_{50}$ | 11 | 0,27735 |

Perlakuan pada uji kombinasi sama dengan uji sitotoksik yaitu dengan menggunakan uji MTT tetapi sampel yang digunakan merupakan sampel kombinasi antara fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi dengan doksorubisin. Hasil dilihat dari intensitas warna ungu ditetapkan secara spektrofotometri dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 550 nm,

setelah diperoleh absorbansi dihitung % kehidupan kemudian dianalisis dengan menggunakan *software Compusyn* untuk memperoleh nilai *combination index* (CI). Nilai $CI=1$ menginterpretasikan kinerja yang aditif antar 2 kombinasi sampel, $CI <1$ sinergis dan, $CI >1$ antagonis [27]. Hasil analisis uji kombinasi dengan *Compusyn* dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil uji kombinasi fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi dengan doksorubisin pada sel limfosit

| Konsentrasi APB ($\mu\text{g/ml}$) | Konsentrasi Doksorubisin ($\mu\text{g/ml}$) | Efek | CI |
|--------------------------------------|---|---------------|----------------|
| 44,0 | 1,1094 | 0,9244 | 5,25609 |
| 44,0 | 1,1094 | 0,8588 | 2,23785 |
| 33,0 | 1,1094 | 0,6722 | 20,3126 |
| 33,0 | 1,1094 | 0,9647 | 34,1302 |
| 22,0 | 1,1094 | 0,8487 | 2,12344 |
| 22,0 | 1,1094 | 0,7277 | 10,8117 |
| 11,0 | 1,1094 | 0,642 | 27,9530 |
| 11,0 | 1,1094 | 0,8386 | 2,31810 |
| 44,0 | 0,83205 | 0,7226 | 8,66038 |
| 44,0 | 0,83205 | 0,8487 | 1,95663 |
| 33,0 | 0,83205 | 0,8739 | 1,61079 |
| 33,0 | 0,83205 | 0,8185 | 2,55427 |
| 22,0 | 0,83205 | 0,9395 | 4,91874 |
| 22,0 | 0,83205 | 0,9445 | 6,26989 |
| 11,0 | 0,83205 | 0,8689 | 1,15286 |
| 11,0 | 0,83205 | 0,9193 | 1,27569 |
| 11,0 | 0,83205 | 0,7731 | 4,55926 |
| 44,0 | 0,5547 | 0,5361 | 39,9340 |
| 44,0 | 0,5547 | 0,8134 | 1,96454 |
| 33,0 | 0,5547 | 0,6268 | 16,3581 |
| 33,0 | 0,5547 | 0,6066 | 20,0574 |
| 33,0 | 0,5547 | 0,3898 | 164,591 |
| 22,0 | 0,5547 | 0,7126 | 6,47401 |
| 22,0 | 0,5547 | 0,9899 | 763,282 |
| 11,0 | 0,5547 | 0,647 | 13,2701 |
| 11,0 | 0,5547 | 0,9849 | 124,461 |
| 44,0 | 0,26635 | 0,9444 | 12,3125 |
| 44,0 | 0,26635 | 0,884 | 1,56503 |
| 33,0 | 0,26635 | 0,6823 | 4,39220 |
| 33,0 | 0,26635 | 0,4806 | 32,6109 |
| 22,0 | 0,26635 | 0,6319 | 7,45885 |
| 22,0 | 0,26635 | 0,7176 | 2,95058 |
| 11,0 | 0,26635 | 0,92436 | 1,30934 |
| 11,0 | 0,26635 | 0,768 | 1,58507 |

Doksorubisin pada penelitian ini digunakan untuk menurunkan sistem imun [2-4] dan fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi digunakan untuk meningkatkan sistem imun [15,17] untuk mengatasi efek samping dari doksorubisin. Pada penelitian ini kedua senyawa tersebut mempunyai kerja yang berlawanan. Sehingga hasil CI yang akan digunakan untuk uji selanjutnya adalah hasil CI tertinggi (>1) atau yang menunjukkan efek antagonis [27]. Dari

hasil analisis *compusyn* ditunjukkan bahwa kombinasi 22,0 $\mu\text{g/mL}$ fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi dan 0,5547 $\mu\text{g/mL}$ doksorubisin menunjukkan nilai CI tertinggi yaitu sebesar 763,282 ($\text{CI}>1$) hal ini menunjukkan bahwa kombinasi tersebut mempunyai efek antagonis terhadap sel normal, dimana doksorubisin dapat berefek toksik terhadap sel normal dan fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak

bumi dapat meminimalisir efek samping doksorubisin tersebut.

KESIMPULAN

Nilai IC_{50} fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi ($44 \mu\text{g/mL}$) lebih besar dibandingkan dengan doksorubisin ($1,1 \mu\text{g/mL}$). Kombinasi $22,0 \mu\text{g/mL}$ fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi dan $0,5547 \mu\text{g/mL}$ doksorubisin menunjukkan nilai CI tertinggi yaitu sebesar 763,282 ($CI > 1$) hal ini menunjukkan bahwa kombinasi tersebut mempunyai efek antagonis terhadap sel normal.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian proliferasi limfosit secara bersamaan dengan uji sitotoksik dan uji kombinasi fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi dan doksorubisin.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada DIKTI atas program Hibah Tim Pascasarjana tahun anggaran 2014/2015.

DAFTAR PUSTAKA

1. Frias, M. A., Lang, U., Gerber-Wicht, C., and James, R. W., 2009, Native and Reconstituted HDL Protect Cardiomyocytes from Doxorubicin-Induced Apoptosis, *Cardiovascular Research*, **81**(6):36-42.
2. Injac, R., M. Perse., N. Obermajer., V. D. Milic., M. Prijatelj., A. Djordjevic., A. Cerar., B. Strukelj., 2008, Potential hepatoprotective effects of fullereneol C60 (OH) 24 in doxorubicin-induced hepatotoxicity in rats with mammary Carcinomas, *Biomaterials* **29**(24-25):451-3460.
3. Patel, D., and Shukla, 2007. Apigenin and Cancer Chemoprevention: Progress, Potensial, Promise (Review). *Internasional Journal of Cancer*, **30**: 233-45
4. Zhang XY, Li WG, Wu YJ. 2005. Amelioration of doxorubicin-induced myocardial oxidative stress and immunosuppression by grape seed proanthocyanidins in tumour-bearing mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **57**, 1043-5.
5. Bhinge, K., and Gupta, V., 2012, The Opposite Effects of Doxorubicin on Bone Marrow Stem Cells Versus Breast Cancer Stem, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **44**(11): 1770-8.
6. Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., Gianni, L. 2004. Anthracyclins: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacology Review*, **56**:185-228.
7. Gewirtz, D.A., 1999, A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin, *Biochemistry Pharmacology*, **57**:727-741.
8. Bruton, L., Lazo, J. S., and Parker, K. L., 2005, *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11th Edition, McGrawHill, Lange
9. Susilowati, A., 2013, Efek Ekstrak Etanol Akar Paaak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) Terhadap Ekspresi Protein CD4 pada Organ Hati Tikus *Sprague Dawley* yang Diberikan *Doxorubicin*, *Skripsi*, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta.
10. Beddir, E., Abou-Gazar, H., Ngwendson, J.N., and Khan I.A., 2003, Eurycomanoid: A new quassinoid from the roots of *Eurycoma longifolia* Jack, *Chem. Pharm. Bull.* **51**(11): 1301-1303
11. Chan, K., L., Choo, C., Y., Abdullah, N., R., and Ismail, Z., 2005, Semisynthetic 15-O-acyl- and 1,15-di-O-acyleurycomanones from *Eurycoma longifolia* as potential antimalarials, *Plan Med*, **71** (10): 967-9

12. Nurhanan, M.Y., Hawairiah, A., Ilham, M.A., and Shukri, M., 2005, Cytotoxic effects of the root extracts of *Eurycoma longifolia* Jack. *Phytother Res*, 19: 994-996.
13. H.T., and Raharja, K., 2002, *Obat-Obat Penting, Khasiat, Penggunaan, dan Efek-Efek sampingnya*, PT. Alex Media Komputindo Kelompok Gramedia, Jakarta, Hal 810.
14. Choo, C.Y. and Chan, K.L. 2002. The Toxicity of some quassinoids from *Eurycoma longifolia*, *Planta Medica*, 68: 662-664.
15. Ang, H. H., Y. Hitotsuyanagi, et al. (2002). Quassinoids from *Eurycoma longifolia*. *Phytochemistry* 59(8): 833-837.
16. Sangat, H.M., Zuhud, E.A.M. dan Damayanti, E.K. 2000. *Kamus Penyakit dan Tumbuhan Obat Indonesia*. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia.
17. Nurani, L. H., 2011, Mekanisme Molekuler Kemopreventif dan Antikanker Senyawa Aktif Akar Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) Kajian *In Vitro* pada sel T47D dan *In Vivo* pada Kanker Payudara pada Tikus SD yang diinduksi DMBA, *Disertasi Universitas Gadjah* 13da, Yogyakarta
18. Tee, T. T. and H. L. P. Azimahtol (2005). Induction of apoptosis by *Eurycoma longifolia* Jack extracts. *Anticancer research* 25(3B): 2205-2213.
19. Doyle, A., dan Griffiths, J. B. 2000. *Cell and Tissue Culture for Medical Research*. John Wiley and Sons Ltd. : New York
20. Depamede, S.N., 2006. Isolation and characterisation of the immunosuppressive peptides in the rats testis. *Thesis*. University of
21. Hay, F.C. & Westwood, O.M.R., 2002, *Practical Immunology* Fourth edition, Blackwell Science, Oxford
22. Meiyanti, 2009, Prosedur Tetap Pengamatan Ekspresi Protein dengan Metode Immunohistokimia, *CCRC*, 03-2-01
23. Agustini, N. W. S. 2012. Aktivitas Antioksidan Dan Uji Toksisitas Hayati Pigmen Fikobiliprotein Dari Ekstrak Spirulina Platensis. *Seminar Nasional IX pendidikan biologi FKIP UNS*. Surakata, Indonesia
24. Srisawat, T., Chumkaew, P., Heed-Chim, W., Sukpondma, Y., and Kanokwiroon, K., Phytochemical screening and cytotoxicity of crude extracts of *Vatica diospyroides symington* type LS, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, vol. 12, 1, pp. 71-76, 2013.
25. Melannisa, R., 2004, Pengaruh PGV-1 Pada Sel Kanker Payudara Yang Diinduksi 17 β -Estradiol: Kajian Antiproliferasi, Pemacuan Apoptosis dan Antiangiogenesis, *Tesis*, Sekolah Pascasarjana, UGM, Yogyakarta
26. Turalely, R., Hadanu, R., Mahulete, F., 2012, Uji Aktivitas Sitotoksik Dan Analisis Fitokimia Ekstrak Daun Kapur (*Harmsioplanax aculeatus* mrs), *Prosiding Insinas*, 1059
27. Chou, T.C., 2010. Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. *American Association for Cancer Research*. 443.

UJI SITOTOKSIK DAN UJI KOMBINASI FRAKSI ETIL ASETAT EKSTRAK ETANOL AKAR PASAK BUMI (EURYCOMA LONGIFOLIA JACK.,) DAN DOKSORUBISIN PADA SEL LIMFOSIT

ORIGINALITY REPORT

13%

SIMILARITY INDEX

PRIMARY SOURCES

| | | |
|---|--|-----------------|
| 1 | Pawan K. Singal. "Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy", New England Journal of Medicine, 09/24/1998 Crossref | 37 words — 1% |
| 2 | ffarmasi.uad.ac.id Internet | 36 words — 1% |
| 3 | www.lume.ufrgs.br Internet | 35 words — 1% |
| 4 | Srisawat, Theera Sukpondma, Yaowapa Chim. "Extracts from vatica diospyroides type SS fruit show low dose activity against MDA-MB-468 breast can", BioMed Research International, Annual 2014 Issue Publications | 31 words — 1% |
| 5 | www.pharmacy.uitm.edu.my Internet | 27 words — 1% |
| 6 | fcee.utm.my Internet | 27 words — 1% |
| 7 | e-journal.uajy.ac.id Internet | 26 words — 1% |
| 8 | indonesianjpharm.farmasi.ugm.ac.id Internet | 25 words — < 1% |

| | | |
|----|--|-----------------|
| 9 | uad.portalgaruda.org Internet | 22 words — < 1% |
| 10 | Zhou, Yong-Dao, and Hongquan Xu. "Space-Filling Fractional Factorial Designs", Journal of the American Statistical Association, 2014. Crossref | 21 words — < 1% |
| 11 | scholar.unand.ac.id Internet | 21 words — < 1% |
| 12 | trisniyati.blogspot.com Internet | 21 words — < 1% |
| 13 | othes.univie.ac.at Internet | 20 words — < 1% |
| 14 | ijcc.iregway.com Internet | 20 words — < 1% |
| 15 | ejournal.unsri.ac.id Internet | 19 words — < 1% |
| 16 | Olaku, Oluwadamilola O., Mary O. Ojukwu, Farah Z. Zia, and Jeffrey D. White. "The Role of Grape Seed Extract in the Treatment of Chemo/Radiotherapy Induced Toxicity: A Systematic Review of Preclinical Studies", Nutrition and Cancer, 2015. Crossref | 18 words — < 1% |
| 17 | eprints.uny.ac.id Internet | 17 words — < 1% |
| 18 | www.inspiredhealthbydesign.com Internet | 16 words — < 1% |
| 19 | io.ppijepang.org Internet | 16 words — < 1% |
| 20 | www.webmd.com Internet | 15 words — < 1% |

| | | |
|----|--|-----------------|
| 21 | scholar.sun.ac.za Internet | 15 words — < 1% |
| 22 | eprints.utm.my Internet | 14 words — < 1% |
| 23 | journal.unpad.ac.id Internet | 14 words — < 1% |
| 24 | publikasiilmiah.ums.ac.id Internet | 13 words — < 1% |
| 25 | evunix.uevora.pt Internet | 12 words — < 1% |
| 26 | Gulluce, M., F. Orhan, D. Yanmis, T. Arasoglu, Z. Guvenalp, and L. O. Demirezer. "Isolation of a flavonoid, apigenin 7-O-glucoside, from <i>Mentha longifolia</i> (L.) Hudson subspecies <i>longifolia</i> and its genotoxic potency", <i>Toxicology and Industrial Health</i> , 2013. Crossref | 12 words — < 1% |
| 27 | naturindonesia.com Internet | 11 words — < 1% |
| 28 | www.ncbi.nlm.nih.gov Internet | 10 words — < 1% |
| 29 | farmasains.uhamka.ac.id Internet | 10 words — < 1% |
| 30 | jpa.ub.ac.id Internet | 10 words — < 1% |
| 31 | docslide.us Internet | 9 words — < 1% |
| 32 | jurnal.usu.ac.id Internet | 9 words — < 1% |
| 33 | repository.ugm.ac.id | |

Internet

9 words — < 1%

34 [istanabenalu.blogspot.com](#)
Internet

9 words — < 1%

35 [pt.scribd.com](#)
Internet

9 words — < 1%

36 [media.unpad.ac.id](#)
Internet

8 words — < 1%

37 [fikapuspita.blogspot.com](#)
Internet

8 words — < 1%

38 [es.scribd.com](#)
Internet

8 words — < 1%

EXCLUDE QUOTES OFF

EXCLUDE MATCHES OFF

EXCLUDE BIBLIOGRAPHY ON